球形芽孢杆菌 TS-1 丙酮粉对七种蚊虫的毒力测定

任改新* 孙桂华** 许荣满*** 张京生*** 陆宝麟***

摘要 用乳糖-丙酮沉淀法制备的球形芽孢杆菌 *Bacillus sphaericus*, TS-1 菌粉对七种蚊虫幼虫进行了毒力测定,以淡色库蚊,致倦库蚊最为敏感,其 LC_{50} 分别为 8.1 μg/L (1.79×10² cfu/ml), 8.9μg/L (1.96×10²cfu/ml),三带喙库蚊敏感性较淡色库蚊差 13 倍,2 龄白纹伊蚊和中华按蚊分别差 20 和 600 倍;黄斑伊蚊,二株埃及伊蚊剂量高达 10⁵—10⁶ cfu/ml 相差 1,000—10,000 倍以上几乎无效。本文结合 *B. t. i.* 标准生物测定方法,对毒力测定中检查时间、数据、虫龄、虫数、饲料等问题进行了讨论。

关键词 球形芽孢杆菌 TS-1 丙酮粉 库蚊 按蚊 伊蚊 毒力测定方法及标准。

球形芽孢杆菌 *Bacillus sphaericus* (下称 *B. S.*) 广泛分布于水域土壤中,为兼性昆虫病原菌;该种群仅有属于血清型 $H_{5a、5b、25}$ 的有些株对蚊幼虫具有高的致病力。对大多数库蚊类幼虫毒效高,对按蚊、伊蚊则因品系而异。该菌不仅对大多数库蚊有高效,且在污水及某些蚊幼孳生地,残效期可长达 9 个月,与苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis* H 14 相比有其独特之处 (Singer, 1980; Davidson, 1982)。1981 年以来我们首次从我国分布的球形芽孢杆菌中分离筛选出 10 余株对蚊幼具有高效的球形芽孢杆菌,对其代表株 TS-1 生物学特性、毒效、生产、毒物本质等进行了系统的研究,结果表明该菌有一定的应用价值(任改新等,1982;1984;1985; Ren Gai-xin 等, 1984)。本文报道该菌 TS-1 丙酮粉按照标准化生物测试程序对七种蚊幼虫的毒效结果,并分析讨论了毒力测定中统计时间、虫龄、虫数、饲料等对测定结果的影响,为高效菌株的筛选及产品标准化毒力测定提供了依据。

材 料 及 方 法

菌种 从南开大学蚊虫孳生地水土样品中分离,经形态、生理生化、血清学鉴定为球形芽孢杆菌血清型 $H_{5a、5b}$ 编号为 TS-1,其有别于标准株 1593 的特性是仅有一条大质粒带,且在 7% NaCl 中能生长(任改新等,1982)。

菌剂的制备 由于 *B. S.* 的杀虫毒力直接与其芽孢形成有关,其毒素主要定位在细胞壁及芽孢壁上 (Myers 等, 1979; 1980),故挑选芽孢形成百分率高,比较同步的单株接种于 NY 肉汤培养基上活化,然后用 NY 固体配方扩大培养(任改新等, 1984),在 30℃

本文于 1984 年 10 月收到。

* 南开大学生物系
** 天津市卫生防病中心
*** 中国人民解放军军事医学科学院五所六室

经 15 天左右，使其芽孢形成达 80% 左右收集菌苔，经洗涤离心（12,000—15,000r/m15′ × 3），称其湿重后参考 Dulmage 等(1970)乳糖-丙酮法，取得均匀易溶解的菌粉制剂（下称菌粉）。以平板计数测其每毫克含菌数为 220.5×10^8/克（包括菌体 Ve、芽孢 S，全部菌落形成单位 CFU）及活芽孢数 179.3×10^8/克（65℃ 30 分钟热处理）。保存在 4℃ 备用。

虫种来源 全部测试用虫均为恒温恒湿养虫室饲育的 2—3 龄幼虫。虫种有淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* Coquillett、致倦库蚊 *C. quinquefasciatus* Say、三带喙库蚊 *C. tritaeniorhynchus* Giles、中华按蚊 *Anopheles sinensis* Wiedemann、白纹伊蚊 *Aedes albopictus* Skuse、埃及伊蚊二株 *Ae. aegypti* Linneus、黄斑伊蚊 *Ae. flavopictus* Yamada。

生物测定 参考世界卫生组织（WHO）对苏云金杆菌血清型 H_{14}(*B. t. i.*) IPS-78 测定标准方法（de Barjac, 1979）进行测定。称取 TS-1 菌粉 50mg 置于 20—50ml 血清瓶内（内含 15 个玻璃珠，10ml 蒸馏水），在 700 次/分混匀器上处理 10 分钟，取其 1ml 于含有 99ml 蒸馏水的锥形瓶中，于混匀器上处理 5 分钟得 50mg/L 原液。

根据预备试验所预测的浓度范围，配制总量为 200ml 的 5—6 个稀释液（使其最高浓度死亡率在 80—95%，最低浓度死亡率在 5—20%）。

每个测定用 500ml 容量的白色搪瓷盆定量加入 150ml 蒸馏水，再加入不同量的原液混匀使其成测试所需浓度。同时选适龄健康幼虫 50 头于小烧杯内，加蒸馏水至 50ml，然后分别全部倒入已稀释好的不同浓度菌液的盆内使其总量为 200ml，每次每个浓度 100 头试虫（对照组 100 头）分两个瓷盆，为了比较或分 4 盆。测试全过程在 26℃ 进行，为减少误差，每个测定结果要在不同日期重复 2—3 次，并计算标准误。

数据分析 实验观察记录 24、48 小时死亡百分率，死亡的标准是幼虫对刺激失灵，对照死亡超过 10% 的实验结果作废，超过 5% 以 Abbott 公式计算校正。所求得不同浓度的死亡百分率，利用 Sharp EL-5002 计算机计算 LC_{50}、标准误、95% 可信限及回归式。

结 果 与 讨 论

1. TS-1 的毒力因昆虫种株不同而异，它们的敏感程度顺序是：淡色库蚊＞致倦库蚊＞三带喙库蚊＞白纹伊蚊＞中华按蚊＞黄斑伊蚊＞埃及伊蚊。其中对淡色、致倦和三带喙三种库蚊毒力最高，其 3 龄幼虫 48 小时 LC_{50} 依次为 8.1μg/L（1.79×10^2cfu/ml*），8.9μg/L(1.96×10^2cfu/ml)，108μg/L（2.381×10^3cfu/ml）。二株埃及伊蚊均不敏感，剂量高达 10^5—10^6cfu/ml，相差大约，1,000—10,000 倍以上，几乎无效。这与 Singer (1980) 的论述相一致。但本文使用：①纯净的病原菌制剂；②实验室饲养供试虫种；③标准的统一试验条件对七种蚊幼虫的测定结果尚属首次报道（见表 1）。

从表 1 可以看出球形芽孢杆菌毒力测定不同于 *B. t. i.* 及一般化学药物，它的死亡高峰在 24—48 小时之间，如中华按蚊二龄幼虫对 TS-1 粉 24 小时和 48 小时 LC_{50} 分别为 17.41 和 5.046mg/L，相差三倍，因此以 48 小时结果为标准有利于比较。此外测定实验以三龄初幼虫较为合适（约 5mm 长，对照死亡极少），不宜用四龄幼虫，以避免在 48 小

* 菌落形成单位（cfu）包括菌体及芽孢

表 1　TS-1 菌粉对七种蚊幼虫的毒力比较

蚊种	龄期	作用时间（小时）	LC_{50}mg/L 及可信限	LC_{50}(cfu/ml)	回归式
淡色库蚊	3	24	0.0169(0.014—0.02)	3.73×10^2	y = 2.5815 + 1.97x
淡色库蚊	3	48	0.008125(0.0049—0.0134)	1.79×10^2	y = 3.6518 + 0.7059x
致倦库蚊	3	24	0.243(0.0213—0.028)	5.34×10^3	y = 1.3537 + 2.631x
致倦库蚊	3	48	0.0089(0.007—0.011)	1.96×10^2	y = 3.375 + 1.715x
三带喙库蚊	3	24	0.42(0.3661—0.4835)	9.261×10^3	y = 3.291 + 2.739x
三带喙库蚊	3	48	0.108(0.0921—0.1264)	2.381×10^3	y = 2.736 + 2.191x
白纹伊蚊	3	24	6.402(5.6038—6.5151)	1.4116×10^5	y = 2.2078 + 3.5807x
白纹伊蚊	3	48	1.7396(1.468—2.06)	3.836×10^4	y = 4.599 + 1.664x
白纹伊蚊	2	48	0.2345(0.18—0.30)	5.17×10^3	y = 2.837 + 1.579x
中华按蚊	2	24	17.41(15.2019—19.8655)	3.839×10^5	y = 1.6159 + 2.727x
中华按蚊	2	48	5.0469(4.4955—5.6653)	1.113×10^5	y = 3.6421 + 1.9351x
黄斑伊蚊	3	48	15mg/L 34%	3.308×10^5	
埃及伊蚊(Bala 株)	3	48	115mg/L 无效	2.536×10^6	
埃及伊蚊(海南株)	3	48	20mg/L 20%	4.41×10^5	

时内有化蛹个体而影响实验结果的统计。

菌剂对白纹伊蚊二、三龄幼虫测定结果表明：三龄幼虫很不敏感，但二龄幼虫则较敏感(见图 1)。

从图 1 可见白纹伊蚊二龄幼虫 48 小时 LC_{50} 为 0.2345mg/L，而三龄则为 1.7396mg/L，毒效相差几乎 8 倍。因此生物测定要获得稳定可靠的数据，既要严格挑选测试虫种，又要选定同龄期生理状况一致的幼虫，在统一的基础上进行比较。由于淡色库蚊饲养容易且最敏感，故 *B. S.* 的生物测定建议用淡色库蚊三龄初幼虫作为标准虫。

2. 生物测定过程中每个试验瓷盆中的虫种虫数均需定量标准化，每次测定总数不能少于 100 头。否则结果即有一定的差异（见图 2）。

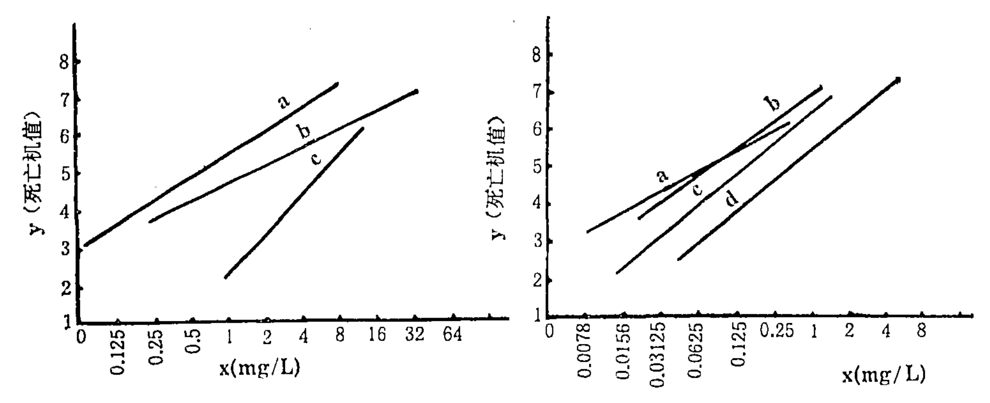


图 1　TS-1 对不同龄期白纹伊蚊的毒力影响
a. 二龄 48 小时　b. 三龄 48 小时
c. 三龄 24 小时

图 2　供试淡色库蚊虫数对 TS-1 毒力测定的影响
a. (25×4)48 小时　b. (50×2)48 小时
c. (25×4)24 小时　d. (50×2)24 小时

3. 关于生物测定过程中添加饲料问题，细菌杀虫剂不同于化学药物作用快，球形芽孢菌的死亡高峰在 24—48 小时，长时间不给蚊幼虫加饲料，幼虫明显衰弱，对照死亡多影响结果的准确性，故建议 24 小时观察后加少许饲料，以提高数据的可靠性。

4. 关于产品标准化，利用乳糖-丙酮沉淀法提取 TS-1 菌剂易为水溶解成均匀的悬液，重复性好，制备简单，不需冷冻干燥设备，可大量制备，再用国际标准标定效价(毒力单位)后提供国内生产使用单位作为国内标准，以比较每批产品的效价。此外上述方法也可用于不同菌株的发酵液的毒力测定，以比较筛选高毒力的菌株或菌剂，结果比较稳定。

在完成上述实验后，我们收到了巴斯德研究所提供的参考标准品——球形芽孢杆菌品系 1593-4 冷冻干燥品 RB-80 效价为 1,000 国际毒力单位。用 RB-80 作 TS-1 粉剂效价测定，根据公式：

$$\text{供测菌剂国际毒力单位 IU/mg} = \frac{\text{标准菌剂的 } LC_{50}}{\text{供测菌剂的 } LC_{50}} \times 1000\text{IU/mg}$$

标定了 TS-1 粉的毒力单位为 542.25ITU，可作为国内参考标准。参考标准品与未知菌剂同时、同条件进行生物测定，不但消除每次测定虫情，操作处理所造成的误差，而且在产品鉴定中用标准品的单位来标定供测品的毒力单位，以达到产品制剂的效价统一而标准化。

参 考 文 献

任改新、陈婉等 1982 球形芽孢杆菌对淡色尖音库蚊的毒性及新分离株。昆虫学报 **25**(3): 349--50。

任改新、孙桂华等 1984 球形芽孢杆菌杀灭淡色库蚊的室内外试验。微生物学通报 **11**(4): 166。

任改新、钱广华等 1985 天津球形芽孢杆菌一号的发酵试验。微生物学通报 **12**(4): 145。

de Barjac, H. 1979 Note sur la preparation d'une formulation de reference. IPS 78, pour le titrage biologique des formulation experimentales et industrielles du serotype H-14 de *Bacillus thuringiensis*. Mimeographed document WHO/VBC/79.741. 6 pages.

Davidson, E. W. 1982 Insecticidal factors from *Bacillus sphaericus* and production of biocides from this organism. in Frank Michal ed., "Basic Biology of Microbial Larvicides of Vectors of Human Diseases". pp 53—63, Geneva, Switzerland.

Dulmage, H. T. Gorrea, J. A. and Martinez, A. J. 1970 Co-precipitation with lactose as a means of recovering the sporecrystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **15**: 15—20.

Myers, P. S. Yousten, A. A. and Davidson, E. W. 1979 Comparative studies of the mosquito larval toxin of *Bacillus Sphaericus* SSII-1 and 1593. Can. *J. Microbiol.*, **25**: 1227—31.

Myers, P. S. and Yousten A. A. 1980 Localization of mosquito larval toxin of *Bacillus sphaericus* 1593. *Appl. and Enviro. Microbiol.*, **39**: 1205—11.

Ren Gai-Xin, Chen Wan et al. 1984 Biochemical and serological characterization of *Bacillus sphaericus* strains and their toxicity to mosquito larvae. in Perry L. Adkisson & Shijun Ma ed., "The Proceedings of The Chinese Academy of Sciences-United States National Academy of Sciences Joint Symposium on Biological Control of Insects", September 25—28, 1982 pp. 419—426, Science Press.

Singer, S. 1980 *Bacillus sphaericus* for the control of mosquitoes. *Biotech., Bioeng.*, **22**: 1335—55.

TOXICITY ASSAY OF ACETONE POWDER FROM *BACILLUS SPHAERICUS* STRAIN TS-1 ON SEVEN SPECIES OF MOSQUITO LARVAE

REN GAI-XIN

(Department of Biology, Nankai University)

SUN GUI-HUA

(Tianjin Hygienic and Anti-epidemic Station)

XU RONG-MAN　ZHANG JING-SHENG　LU BAO-LIN

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences)

The larvicidal potency to mosquito larvae of acetone powder precipitated from *Bacillus sphaericus* strain Ts-1 which was isolated from a water pool in Nankai University campus in Tianjin has been studied. The results from laboratory tests showed that the *Culex* larvae including *C. pipiens pallens, C. quinquefasciatus* and *C. tritaeniorhynchus* were highly susceptible, with LC_{50} of 8.1 μg/l (1.79×10^2 cfu/ml), 8.9 μg/l (1.96×10^2 cfu/ml) and 108.0 μg/l (2.38×10^2 cfu/ml) after 46 hour treatment respectively, while *Anopheles sinensis* was less susceptible, with LC_{50} of 5.069 mg/l. The second to third instar larvae of *Aedes albopictus* was also susceptible with LC_{50} of 0.2—1.7 mg/l, while *Ae. aegypti* and *Ae. flavopictus* were not, with LC_{50} up to 15—115 mg/l (10^{5-6} cfu/ml). The technique of toxicity assay is discussed.

Key words　*Bacillu sphaericus* strain TS-1 —— *Culex* —— *Anopheles* —— *Aedes* —— toxicity assay and standard